

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/004270

International filing date: 04 March 2005 (04.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-062435
Filing date: 05 March 2004 (05.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 28 April 2005 (28.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

04. 4. 2005

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP2005/004270

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2004年 3月 5日

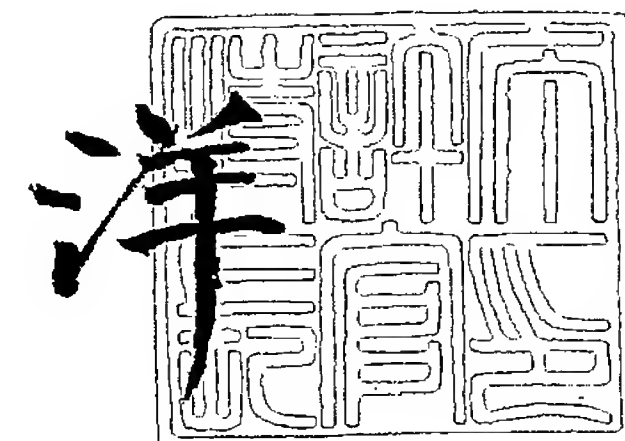
出願番号
Application Number: 特願2004-062435
[ST. 10/C]: [JP2004-062435]

出願人
Applicant(s): 株式会社資生堂

2005年 3月30日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



出証番号 出証特2005-3028246

【書類名】 特許願
【整理番号】 1034765
【提出日】 平成16年 3月 5日
【あて先】 特許庁長官 今井 康夫 殿
【国際特許分類】 G01N 33/50
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区早渕 2 - 2 - 1 株式会社資生堂 リサーチセンター（新横浜）内
 【氏名】 岩井 一郎
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区早渕 2 - 2 - 1 株式会社資生堂 リサーチセンター（新横浜）内
 【氏名】 平尾 哲二
【特許出願人】
 【識別番号】 000001959
 【氏名又は名称】 株式会社資生堂
【代理人】
 【識別番号】 100099759
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 青木 篤
 【電話番号】 03-5470-1900
【選任した代理人】
 【識別番号】 100077517
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 石田 敬
【選任した代理人】
 【識別番号】 100087413
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 古賀 哲次
【選任した代理人】
 【識別番号】 100117019
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 渡辺 陽一
【選任した代理人】
 【識別番号】 100082898
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 西山 雅也
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 209382
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0305959

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

角層中の酸化タンパク質を指標とする、角層の透明性及び／又は保水性を評価するための方法。

【請求項 2】

皮膚から採取した角層試料中の酸化タンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識し、その蛍光を検出することで角層酸化タンパク質の検出を行う、請求項 1 記載の角層の透明性及び／又は保水性を評価するための方法。

【請求項 3】

角層の透明性及び／又は保水性を指標とする、角層中のタンパク質の酸化度を検出するための方法。

【請求項 4】

角層中のタンパク質の酸化を抑制することにより、角層の透明性及び／又は保水性を保持・向上させる方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】角層中の酸化タンパク質を指標とする角層の透明性・保水性を評価する方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、角層中の酸化タンパク質を指標とした角層の透明性・保水性の評価方法、角層の透明性・保水性を指標とした角層中のタンパク質の酸化度の検出方法、さらには角層中のタンパク質の酸化を抑制することにより、角層の透明性・保水性を保持・向上させる方法に関する。

【背景技術】

【0002】

肌質（または皮膚の状態）を的確に把握することは、より健康な皮膚を維持するための確かなスキンケアを行う上で重要である。そのため、化粧品によるスキンケアを実施するに際し、例えば、美容技術者による問診などを通じて、化粧品の使用者の肌質が評価されてきた。また、肌質の客観的な評価を目的として、各種の計測機器を使用して、観察又は測定されるパラメーターにより、皮膚の状態または機能を評価することも行われている。

【0003】

近年、皮膚の加齢に伴う老化や光老化との関係で、角層酸化タンパク質の研究が盛んに行われている。主な酸化タンパク質として、酸化を受けた結果カルボニル基の導入されたタンパク質があり、一般に、タンパク質におけるLys、Arg、Proといったアミノ酸残基のN_{H2}基が直接酸化されてカルボニル基となった結果生成されたものと、脂質が酸化して過酸化脂質、更には分解して反応性の高いアルデヒドとなり、それがタンパク質と結合することで生成されたものがある。酸化タンパク質は老化関連での研究が豊富にされており、加齢（脳、肝、線維芽細胞）、アルツハイマー病、早老症（Werner症候群）等において増加することが認められている。

【0004】

皮膚においては、皮膚表面の皮脂がフリーラジカルによって酸化し、過酸化脂質が生成することでタンパク質の酸化は開始され、いったん過酸化脂質が生成されると、酸化は連鎖的に進行し、肌表面に刺激を与えるだけにとどまらず、角質層の奥まで入り込んで細胞にダメージを与えるものと考えられる。従って、皮膚の酸化タンパク質の性状、例えば存在量、分布状態等を評価し、肌質または皮膚の状態を把握し、その後のスキンケア法の方針決定や化粧品の選定のためにその評価結果を何らかの形で活用できるものと期待される。しかしながら、現在のところ、酸化タンパク質と皮膚のダメージとの間に漠然とした関係が存在すると予測されてはいるものの、角層タンパク質の酸化が皮膚の性状に実際にどのような影響を及ぼしているかについては解明されるに至っていない。

【0005】

【特許文献1】特開2001-91514号公報

【非特許文献1】FEBS Letter 1998 Feb 6, 422(3), 403-406

【非特許文献2】J. Invest. Dermatol. 1999, Sep, 113(3), 335-359

【非特許文献3】J. Invest. Dermatol. 2002, Apr, 118(4), 618-625

【非特許文献4】Analytical Biochemistry 1987, 161, 245-257

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

皮膚に存在する酸化タンパク質の評価結果を肌質の改善などに活用できれば、皮膚学的・化粧学的側面において極めて有益であると予測され、例えば近年における化粧品業界などで行われている適切なスキンケア法などのアドバイスを目的とするカウンセリングサービスの提供のための有力な手段ともなり得る。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者は、上記事実を鑑み、角層タンパク質が皮膚の性状に及ぼす影響を検討したところ、角層タンパク質の酸化が進行するにつれ角層の保水性及び透明性が失われていくことを見出した。紫外線照射や乾燥、老化などが原因で角層の保水性・透明性が失われることはある程度予想されるが、角層の保水性・透明性の低下に角層タンパク質の酸化が関与していることははじめて見出された事実であり、このような事実の解明は皮膚学的、化粧品学的見地から極めて有意義である。

【0008】

従って、上記事実の解明に基づき、本発明は第一の観点において、角層中の酸化タンパク質を指標とする、角層の透明性及び／又は保水性を評価するための方法を提供する。好適な態様において、角層酸化タンパク質の検出は、皮膚から採取した角層試料中の酸化タンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識し、その蛍光を検出することで行う。酸化タンパク質のカルボニル基の特異的な蛍光標識は、好ましくは酸化タンパク質にヒドラジノ基含有蛍光物質、例えばフルオレセイン-5-チオセミカルバジド、テキサスレッドヒドラジドなどを用いて行う。

別の観点からすると、本発明は、角層の透明性及び／又は保水性を指標とする、角層中のタンパク質の酸化度を検出するための方法を提供する。

さらには、本発明は角層中のタンパク質の酸化を抑制することにより、角層の透明性及び／又は保水性を保持・向上させる方法を提供する。

【発明の効果】

【0009】

角層タンパク質の酸化が及ぼす肌への影響の解明により、角層酸化タンパク質を指標としたスキンケア手段の提供が可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

第一の観点において、本発明は、角層中の酸化タンパク質を指標とする、角層の透明性及び／又は保水性を評価するための方法を提供する。

角層又は肌の「透明性」が高いと、あたかも肌が透き通って見えるような状態になり、美容上きわめて好ましい外観を示すことになる。また、角層又は肌の「保水性」が高い皮膚では肌がみずみずしく、潤いのある健康な状態になる。そのため肌が「透明性」・「保水性」を有することは美容学上極めて重要であり、一般に角層や肌の「透明性」や「保水性」は美容技術者などの美容専門家の主観を頼りとした官能テストや、面倒な操作、高価な装置・設備を必要とする皮膚試料の光学的検査や水分検査などにより行われていた。本発明は角層中の酸化タンパク質を指標とすることで、より詳しくは角層中の酸化タンパク質の存在量、分布状態等を検出することで、角層、ひいては肌の「透明性」・「保水性」をより簡単かつ客観的な手段で調べることを可能とする。

【0011】

角層酸化タンパク質に関する研究が多々行われており、その検出方法にも様々なものが知られている。本発明において、角層酸化タンパク質の検出方法は特に制限されるものではなく、当業界周知の様々な方法を利用することができる。例えば、J.J.Thiele et al. FEBS Letter 1998 Feb 6, 422(3), 403-406に記載の角層酸化タンパク質の検出方法では、粘着テープを皮膚表層に貼付け、剥がすといったいわゆるテープストリッピング操作を行うことで角層の付着したテープ（「テープ角層」）を獲得し、酸化タンパク質をELISAにて検出する方法である。J.J.Thiele et al. J. Invest. Dermatol. 1999, Sep, 113(3), 335-359に記載の方法は、テープ角層からタンパク質抽出を行い、可溶性成分をDNPH標識し、SDS-PAGEにかけ、抗DNP抗体を用いてウェスタンブロットを行うことで酸化タンパク質の検出を行っている。C.S.Sander et al. J. Invest. Dermatol. 2002, Apr, 118(4), 618-625に記載の方法は、ヒト皮膚組織切片をDNPHで標識し、抗DNPで染色することで酸化タンパク質の検出を行っている。

【0012】

本発明の好適な態様において、角層酸化タンパク質の検出は、皮膚から採取した角層試

料中の酸化タンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識し、その蛍光を検出することで行う。かかる検出は蛍光顕微鏡下で行うことができる。酸化タンパク質のカルボニル基の特異的な蛍光標識は、好ましくは酸化タンパク質にヒドラジノ基含有蛍光物質、例えばフルオレセイン-5-チオセミカルバジド、テキサスレッドヒドラジドなどを用いて行つてよい。この方法によれば、例えば蛍光顕微鏡により得た検出結果を画像化することで、皮膚角質層の酸化タンパク質の皮膚上での性状の二次元的な情報を簡易に獲得し、例えば化粧品等の販売の際のカウンセリングサービスにおけるかかる酸化タンパク質の情報の活用を図ることが可能となる。

【0013】

本発明において、皮膚由来の角層試料は、身体のいずれの部分に由来する試料でもよく、また、かような試料（組織もしくは細胞）の培養物であってもよい。該試料の由来する身体の部分または領域の典型例としては、顔面の頬、額、手甲および体幹などを挙げることができる。

【0014】

このような試料は、所謂、外科的手段等の侵襲的な方法により取得されたものであってもよいが、殊に肌質の評価を目的とする場合には、簡易さを理由に、非侵襲的な方法により皮膚から取得されるものであることが好ましい。非侵襲的な方法としては、当該技術分野で常用されているテープストリッピングや擦過法等を挙げるができる。

【0015】

テープストリッピングは、皮膚表層に粘着テープ片を貼付、剥がすことを実施することで、皮膚の二次元的状態をその粘着テープにそのまま転写させることができるため、本発明において特に好ましい。テープストリッピングによりテープ角層を採取し、裁断せずにそのままの状態に酸化タンパク質を特異的に蛍光染色すれば、実際の皮膚の二次元的性状に対応した酸化タンパク質の二次元的情報が得られることとなる。

【0016】

テープストリッピングの好ましい方法は、まず皮膚の表層を例えばエタノールなどで浄化して皮脂、汚れ等を取り除き、適当なサイズ（例えば5×5cm）に切った粘着テープ片を皮膚表面の上に軽く載せ、テープ全体に均等な力を加えて平たく押さえ付け、その後均等な力で粘着テープを剥ぎ取ることで行われる。粘着テープは市販のセロファンテープなどであってよく、例えばScotch Superstrength Mailing Tape（3M社製）等が使用できる。

【0017】

本発明の好適な態様において利用できる酸化タンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識する蛍光物質は、酸化タンパク質のカルボニル基に結合できるヒドラジノ基



を有するものが好ましい。そのような蛍光物質の例には、フルオレセイン-5-チオセミカルバジド、テキサスレッドヒドラジドなどが挙げられる。

【0018】

このようなヒドラジノ基含有蛍光物質を使用する場合、酸化タンパク質の検出は、具体的には、例えば以下のようにして実施できる：

- (1) 角層試料を、例えばテープストリッピングにより、採取する；
- (2) これに適当な緩衝液（例えば100mMのMES-Na緩衝液（pH5.5））中のヒドラジノ基含有蛍光物質を室温にて数時間（例えば1時間）反応させる；
- (3) 反応終了後に適当な生理溶液（例えば緩衝液リン酸緩衝生理食塩液（PBS））にて十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡にて酸化タンパク質を検出する；
- (4) 任意的に、蛍光顕微鏡撮影する。

【0019】

酸化タンパク質の特異的な蛍光標識は、ビオチンヒドラジドと蛍光標識アビジンとの組み合わせを用いることもできる。ビオチンヒドラジドもヒドラジノ基を有するため、タンパク質のカルボニル基に結合できる。この場合、まず酸化タンパク質にビオチンヒドラジドを結合させ、しかる後に蛍光標識アビジンをビオチン-アビジン結合を介してビオチンヒ

ドラジドに結合させ、その結果酸化タンパク質は蛍光標識される。ビオチンヒドラジドは当業界においてよく知られ、例えばピアース社から製造販売されているものを使用することができる。また、蛍光アビジンは、例えばフルオレセインアビジンなどが使用できる。

【0020】

このようなヒドラジノ基含有蛍光物質を使用する場合、酸化タンパク質の検出は、具体的には、例えば以下のようにして実施できる：

- (1) 角層試料を、例えばテープストリッピングにより、採取する；
- (2) これに適当な緩衝液（例えば100mMのMES-Na緩衝液（pH5.5））中のビオチンヒドラジドを室温にて数時間（例えば1時間）反応させる；
- (3) 反応終了後に適当な生理溶液（例えば緩衝液リン酸緩衝生理食塩液（PBS））にて十分に洗浄した後、蛍光標識アビジンを室温にて数時間（例えば1時間）反応させる；
- (4) 蛍光顕微鏡にて酸化タンパク質を検出する；
- (5) 任意的に、蛍光顕微鏡撮影する。

【0021】

酸化タンパク質の特異的な蛍光標識は、酸化タンパク質のカルボニル基にジニトロフェニルヒドラジンを作用・結合させ、そのジニトロフェノール部分を蛍光色素で標識することで行うこともできる。従って、本発明の更なる好適な態様では、酸化タンパク質のカルボニル基に結合させたジニトロフェニルヒドラジンのジニトロフェノール部分を蛍光免疫測定法等で検出することができる。

【0022】

このようなジニトロフェニルヒドラジンを利用して蛍光標識する場合、酸化タンパク質の検出は、具体的には、例えば以下のようにして実施できる：

- (1) 角層試料を、例えばテープストリッピングにより、採取する；
- (2) これに適当な緩衝液（例えば100mMのMES-Na緩衝液（pH5.5））中のジニトロフェニルヒドラジン（DNPH）を室温にて数時間（例えば1時間）反応させる；
- (3) 反応終了後に適当な生理溶液（例えば緩衝液リン酸緩衝生理食塩液（PBS））にて十分に洗浄した後、抗DNP抗体、例えばウサギDNP抗体（ZYMED社製）の同生理溶液を室温にて数時間（例えば1時間）反応させる；
- (4) 反応終了後に同生理溶液にて十分に洗浄し、上記抗DNP抗体に特異的な蛍光標識二次抗体、例えばフルオレセイン標識抗ウサギIg（アマシャムファルマシアバイオテク社製）等を室温にて数時間（例えば1時間）反応させる；
- (5) 蛍光顕微鏡にて酸化タンパク質を検出する；
- (6) 任意的に、蛍光顕微鏡撮影する。

【0023】

別の観点からすると、本発明は、角層の透明性及び／又は保水性を指標とする、角層中のタンパク質の酸化度を検出するための方法を提供する。上述のとおり、本発明者は角層タンパク質の酸化が肌の「透明性」・「保水性」に影響を及ぼすことを見出したが、角層タンパク質の酸化は皮膚に肌の老化を含むその他の様々な性状に影響を及ぼしている可能性もある。従って、角層の「透明性」・「保水性」を指標に、角層タンパク質の酸化が原因とする皮膚老化をはじめとする様々なその他の性状の早期発見・対処が可能ともなり得る。上述のとおり、角層や肌の「透明性」や「保水性」は美容技術者などの美容専門家の主観を頼りとした官能テストや、皮膚試料の光学的検査や水分検査などにより行うことができる。

【0024】

本発明はまた、角層中のタンパク質の酸化を抑制することにより、角層の透明性及び／又は保水性を保持する方法を提供する。角層タンパク質の酸化の抑制は、適当な抗酸化剤、例えばアスコルビン酸、ビタミンEなどの周知の化合物を適当な溶媒に溶解し、肌に適量適用するなどして達成可能である。

【0025】

以下、具体例を挙げて、本発明を更に具体的に説明する。なお、本発明はこれにより限

定されるものではない。

【実施例】

【0026】

実験1：角層酸化タンパク質を指標とする角層の「保水性」の評価（1）

乾燥豚皮（アロアスク、大鵬薬品工業株式会社）を水に3日間浸漬した。豚皮を取り出し、0、1、10、100mMのアクロレイン（東京化成工業株式会社）溶液に3時間浸漬して酸化処理した。アクロレインはタンパク質に作用することで酸化させ、アルデヒドタンパク質付加体を生成する。酸化処理後、水で1時間洗浄した。洗浄後、角層側を上に向けてシャーレ上で乾燥（湿度50%、温度25℃）を開始し、15分後の角層水分量をスキコン200（アイ・ビー・エス株式会社）で測定した。

【0027】

角層水分量の結果をスキンコンダクタンス値として、図1に示す。図1から明らかなとおり、アクロレインによる酸化処理濃度依存的な水分量低下が観察された。すなわち、酸化処理による角層水分保持力の低下が観察された。

【0028】

実験2：角層酸化タンパク質を指標とする角層の「保水性」の評価（2）

黒豚皮膚を10mMアクロレイン（東京化成工業株式会社）溶液で1時間、酸化処理した。水で1時間洗浄した後、水分をよく拭き取り、角層水分量の変化をスキコン200によって経時で測定した。

【0029】

その結果を図2に示す。アクロレインでの酸化処理により角層水分保持力の低下が豚皮膚で観察された。

【0030】

実験3：角層酸化タンパク質を指標とする角層の「保水性」の評価（3）

黒豚皮膚を20mMの次亜塩素酸で1時間処理した。水で1時間洗浄した後、水分をよく拭き取り、角層水分量の変化をスキコンによって経時で測定した。

【0031】

その結果を図3に示す。次亜塩素酸での酸化処理によっても角層水分保持力の低下が豚皮膚で観察された。

【0032】

実験4：角層酸化タンパク質を指標とする角層の「保水性」の評価（4）

ヒト腕皮膚をPBS又は20mMの次亜塩素酸で1時間、閉塞処理した。水で1時間洗浄後、水分をよく拭き取り、角層水分量の変化をスキコンによって経時で測定した。

【0033】

その結果を図4に示す。酸化処理による角層水分保持力の低下がヒト皮膚でも観察された。

【0034】

実験5：角層酸化タンパク質を指標とする角層の「透明性」の評価

乾燥豚皮（アロテスク、大鵬薬品工業株式会社）を水に3日間浸漬した。豚皮を取り出し、0、1、10、100mMのアクロレイン（東京化成工業株式会社）溶液に3時間浸漬して酸化処理した。酸化処理後、水で1時間洗浄した。洗浄後、角層側を上に向けてシャーレ上で乾燥（湿度50%、温度25℃）を開始し、24時間かけて乾燥させた豚皮の外観を目視観察した。

【0035】

その結果を図5に示す。図5から明らかなとおり、酸化処理を施していない豚皮の透明度は高いのに対し、アクロレインで処理すると、濃度依存的に透明度は低下した。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】アクロレイン処理による豚皮角層水分保持力の低下を示すグラフ。

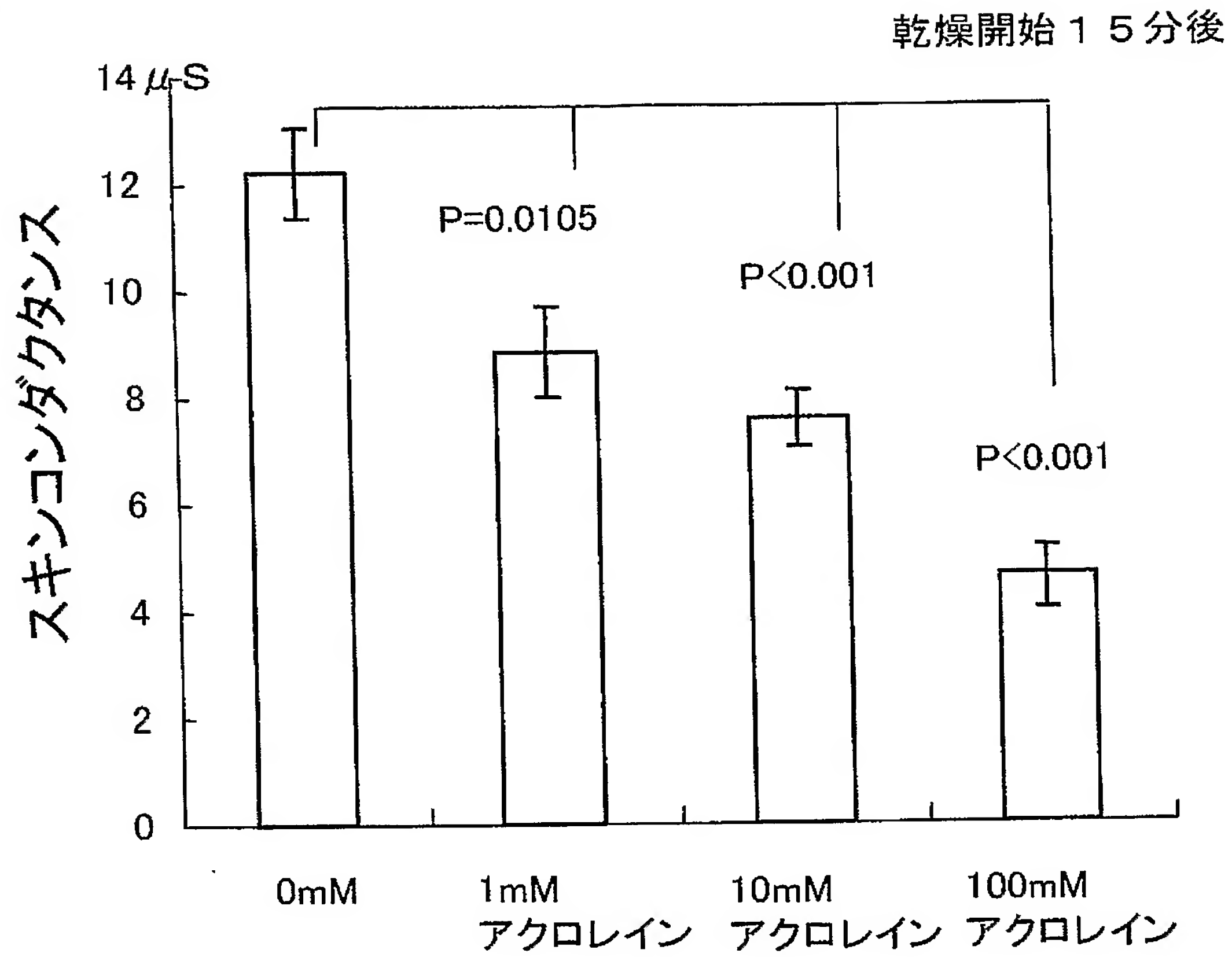
【図2】アクロレイン処理による豚皮角層水分保持力の低下を示すグラフ。

- 【図 3】 次亜塩素酸による豚皮角層水分保持力の低下を示すグラフ。
- 【図 4】 次亜塩素酸処理によるヒト腕皮膚角層水分保持力の低下を示すグラフ。
- 【図 5】 アクロレイン処理による豚皮角層透明性の低下を示す図。

【書類名】 図面

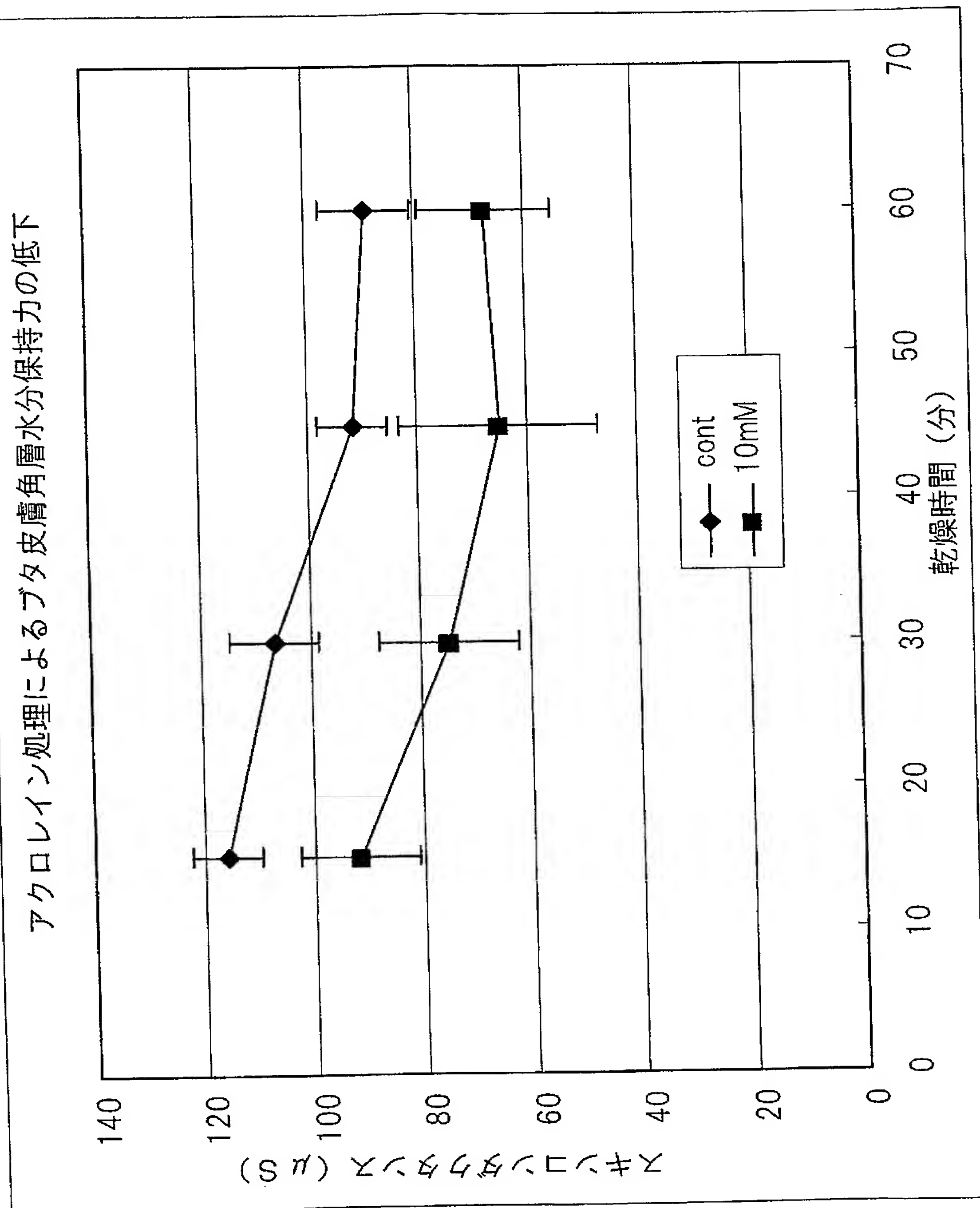
【図 1】

図 1



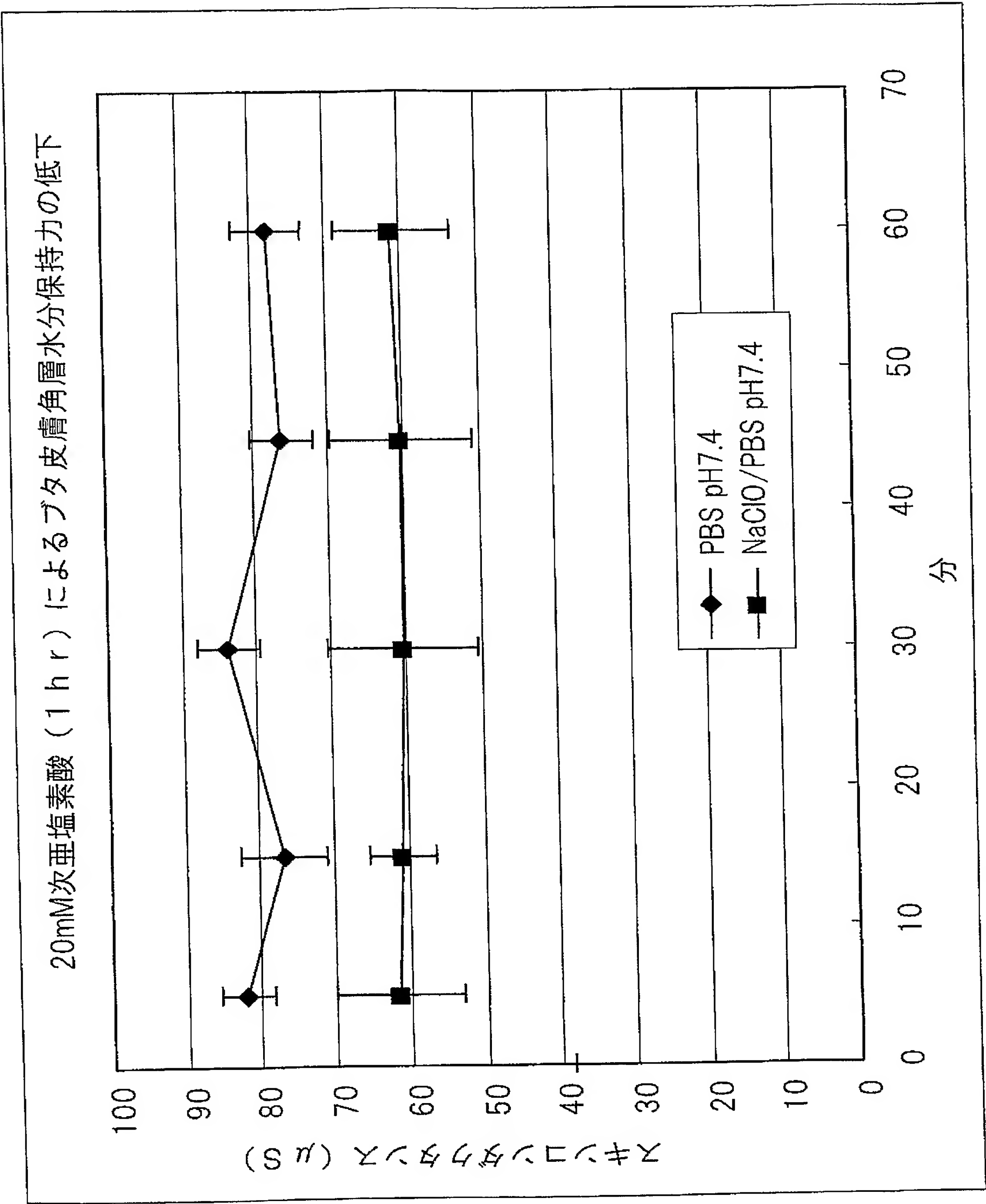
【図 2】

図2



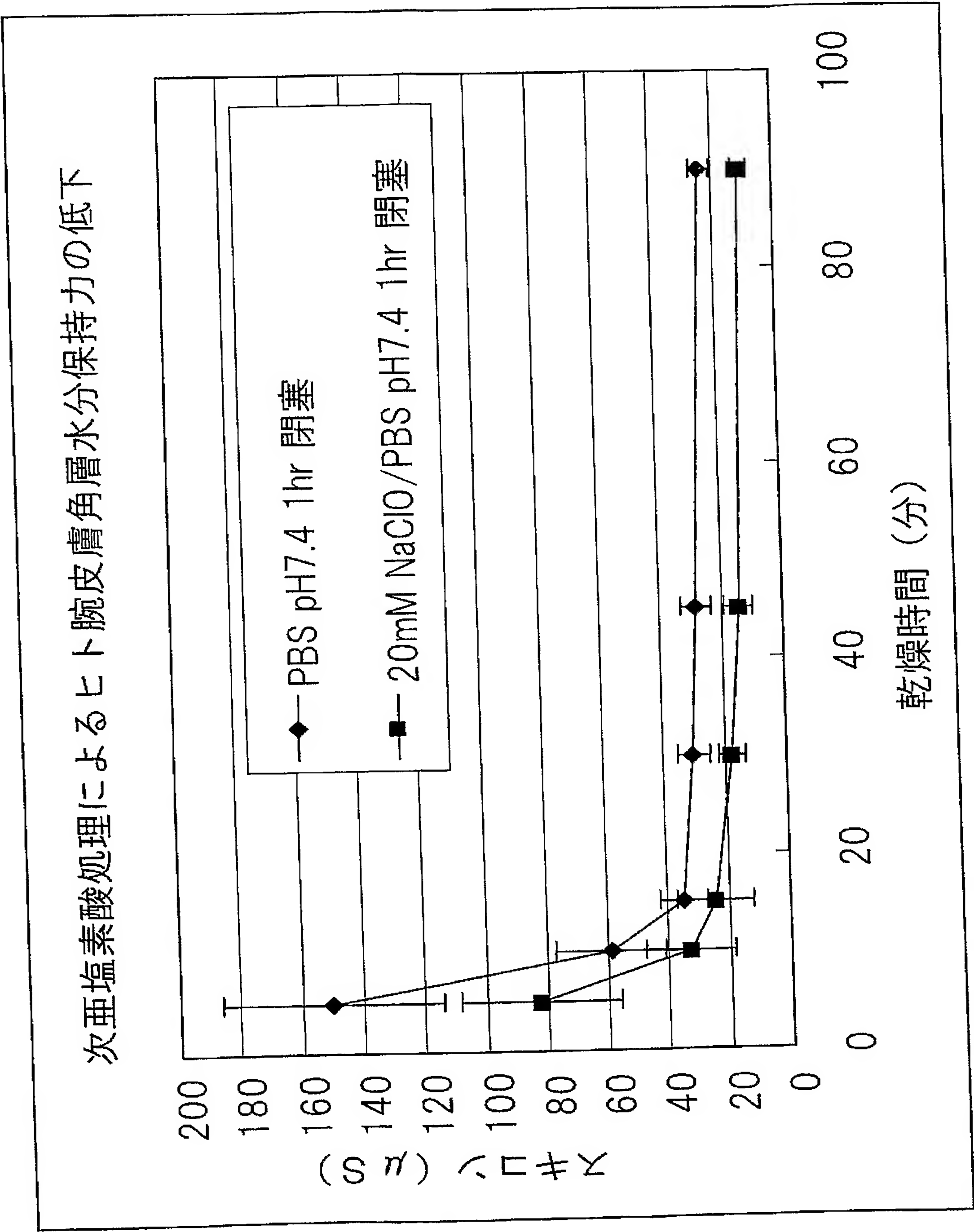
【図 3】

図 3



【図 4】

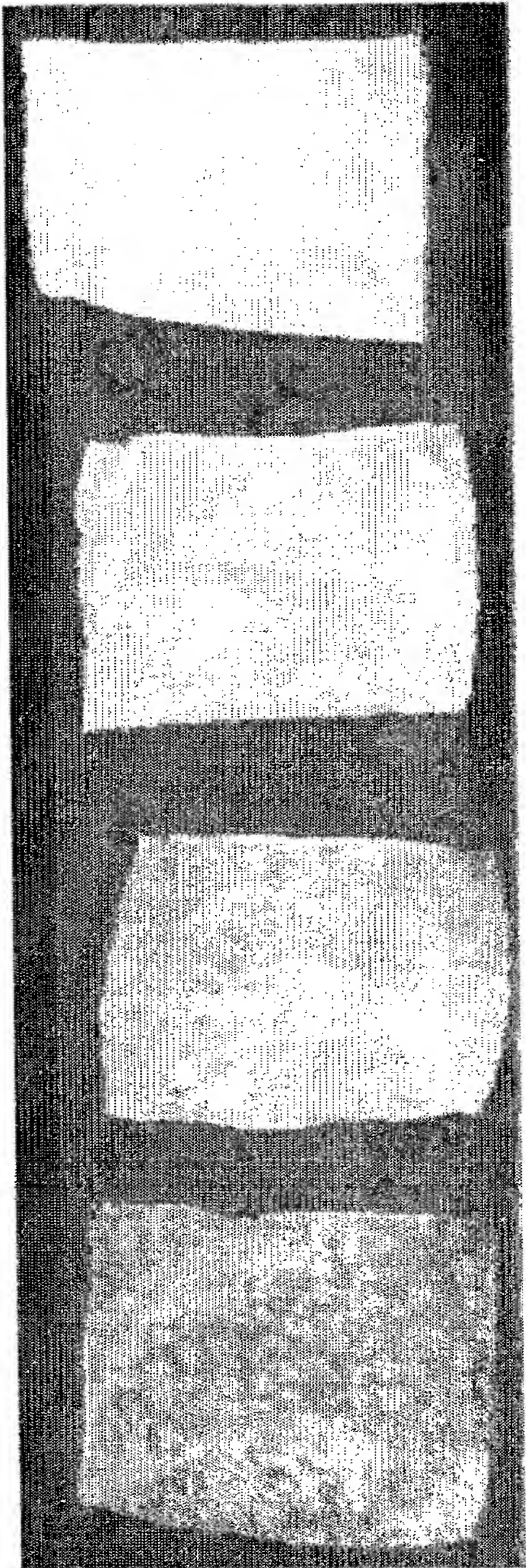
図4



【図 5】

図5

0mMアクリロイン 1mMアクリロイン 10mMアクリロイン 100mMアクリロイン



50%湿度、25°C、24hr

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 角層中の酸化タンパク質の評価結果を肌質の改善などに活用すること。

【解決手段】 本発明は、角層中の酸化タンパク質を指標とした角層の透明性・保水性の評価方法を提供する。

【選択図】 図 1

特願 2 0 0 4 - 0 6 2 4 3 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 1 9 5 9]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 2 7 日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区銀座 7 丁目 5 番 5 号

氏 名 株式会社資生堂